

白细胞介素6可能通过Jak2诱导平滑肌细胞成骨样分化及钙化

郭欣欣, 曲一丹, 赵旋

青岛大学附属医院, 山东 青岛
Email: Guo_xinxin@163.com

收稿日期: 2021年5月7日; 录用日期: 2021年5月25日; 发布日期: 2021年6月9日

摘要

目的: 探讨IL6诱导平滑肌细胞钙化及成骨样分化的机制。方法: 体外培养平滑肌细胞, 分别给予IL6、IL6 + CP690550干预细胞, 设空白对照。免疫印迹法(Western blot)检测钙化相关分子TNAP、转录因子Runx2、Jak2的表达, 邻甲酚酞法(O-cresolphthalein)检测不同时间的钙盐含量。结果: IL6组较空白组, 钙盐含量明显高于对照组, 同时TNAP、Runx2、Jak2的表达明显上调。给予Jak2抑制剂后, 较空白组TNAP、Runx2表达明显下调。结论: IL6可能通过Jak2诱导平滑肌细胞成骨样分化及钙化。

关键词

白细胞介素6, 平滑肌细胞, 钙化, 成骨样分化, Jak2

Interleukin 6 May Induce Osteogenic Differentiation and Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells through Jak2

Xinxin Guo, Yidan Qu, Xuan Zhao

The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong
Email: Guo_xinxin@163.com

Received: May 7th, 2021; accepted: May 25th, 2021; published: Jun. 9th, 2021

Abstract

Objective: To investigate the mechanism of IL6 inducing calcification and osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells. **Methods:** Vascular smooth muscle cells were cultured *in vitro*,

IL6 and IL6 + CP690550 were given to the intervention cells respectively, and a blank control was set. Western blotting was used to detect the expression of calcification-related molecules TNAP, transcription factor Runx2 and Jak2, and the o-cresolphthalein method was used to detect the calcium salt content at different times. Results: Compared with the blank group, the IL6 group had significantly higher calcium content than the control group, and the expressions of TNAP, Runx2 and Jak2 were significantly up-regulated. After adding Jak2 inhibitor, the expressions of TNAP and Runx2 were significantly down-regulated compared with the blank group. Conclusion: IL6 may induce osteogenic differentiation and calcification of vascular smooth muscle cells through Jak2.

Keywords

Interleukin 6, Vascular Smooth Muscle Cells, Calcification, Osteogenic Differentiation, Jak2

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

血管钙化(Vascular Calcification, VC)常见于高血压、慢性肾脏病、糖尿病、类风湿性关节炎等疾病,是血管病变的风险因素和预后不良的指标[1] [2]。血管平滑肌细胞(Vascular Smooth Muscle Cell, VSMC)在炎症或氧化应激等因素的刺激下会出现成骨样分化的特征,如骨相关因子 runt 相关转录因子(Runt-related Transcription Factor 2, Runx2)以及组织非特异性碱性磷酸酶(Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase, TNAP)的上升从而诱导血管钙化[3]。慢性肾脏病(Chronic Kidney Disease, CKD)的患者和接受慢性透析的患者中,高磷酸盐血症是血管钙化的最重要病因之一,而高水平的氧化应激,血清 C 反应蛋白(CRP),炎症细胞因子等被称为心血管疾病的危险因素[4] [5] [6]。

研究表明,血清白细胞介素 6 (Interleukin 6, IL6)的血清水平随肾功能障碍的恶化而增加,血清 IL6 较高的患者心血管死亡率较高[7]。Caselli 等证实血清 IL6 升高可能是冠状动脉疾病导致死亡的危险因素,而 IL-6 是开始透析治疗的患者死亡率的独立预测因子[8]。Hénaut L 等发现 IL6 是 VSMC 成骨转化和矿化的著名诱导剂[9],在慢性肾脏病患者中,IL6 较其他炎症标记物(如 C 反应蛋白,白蛋白或 TNF- α)能更好地预测死亡风险。同时,体外研究已经证明 IL6 增强钙化相关基因的表达和钙化血管平滑肌细胞[10] [11]。但是,IL-6 对 VSMCs 转录调控的机制仍不清楚。

本文通过体外培养平滑肌细胞,重组人 IL6 体外诱导细胞钙化,探讨 IL6 诱导平滑肌细胞钙化及成骨样分化的机制。

2. 实验材料与方法

2.1. 材料

DMEM、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司), IL6 (美国 RD Systems), 成骨诱导剂(50 μ M 抗环血酸、10 μ M β -甘油磷酸钠、0.1 μ M 地塞米松,广州赛业生物科技有限公司), 一抗 β -actin (美国 Cell Signal 公司)、Runx2 (美国 Abcam 公司), Jak2 (美国 Cell Signal 公司)组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP, 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司), 二抗羊抗兔 IgG、羊抗鼠 IgG (美国 Abbkine 公司), FITC 羊抗兔(Elabscience 公司), 钙含量检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司), Triton X-100、DAPI 溶液、山羊封闭血清、青 - 链霉素。

2.2. 平滑肌细胞的培养及干预条件

取青岛大学附属医院健康新生胎儿脐带, 无菌分离脐动脉, 用眼科剪将血管中膜剪成约 $0.5\sim 1\text{ mm}^3$ 的小块, 用弯头吸管, 将血管小块移入 25 cm^2 塑料培养瓶内, 以 $5\text{ 块}/\text{cm}^2$ 密度均匀种植于培养瓶底部, 加入 4 ml 含双抗 DMEM (20% FBS), 将培养瓶于 37°C 、 5% CO_2 培养箱(湿度 100%)内静置培养, 待组织块贴附后, 将培养瓶缓慢翻转平放培养。3 d 后换新鲜培养液, 以后每 3 d 换液 1 次, 每次只换 $2/3$ 量, 保留 $1/3$ 的原液, 待细胞融合到 80%, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化 1:3 传代。取第 3~5 代细胞进行实验

2.3. 蛋白质印迹法检测钙化及成骨分化相关蛋白以及 Jak2 表达水平

采用常规培养、 100 ng/ml IL6、IL6 + CP690550 干预细胞, 裂解实验干预后的细胞, 每个样本每孔加入 $20\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白液, 经十二烷基磺酸钠 - 聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)胶电泳后转膜, 以 5% BSA 溶液室温封闭 1 h, β -actin、Runx2、Jak2 (1:1000)、TNAP (1:500)一抗工作液 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤 $10\text{ min} \times 3$ 次, 分别加入羊抗兔或鼠 IgG (H + L) 抗体(1:10,000)室温下摇床孵育 60 min, TBST 洗涤 $10\text{ min} \times 3$ 次, ECL 显色、曝光、显影、定影。凝胶成像系统分析并拍照, 以蛋白条带的强度代表蛋白的表达量。

2.4. 钙盐含量的测定

采用常规培养、 100 ng/ml IL6 干预细胞 24 h、48 h、72 h, 裂解实验干预后的细胞, 取其上清用钙含量检测试剂盒检测钙含量, 并用 BCA 法检测其蛋白含量。用蛋白浓度校正钙浓度。

2.5. 统计学处理

数据采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 实验结果

3.1. IL6 诱导平滑肌细胞钙化

将细胞以 $5 \times 10^4/\text{L}$ 接种于 6 孔细胞培养板中, 常规给予 DMEM + 成骨诱导培养。用 100 ng/ml IL6 干预细胞 24 h、48 h、72 h, 检测钙盐含量, 结果显示, 较空白对照组 IL6 组钙盐含量明显升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1。

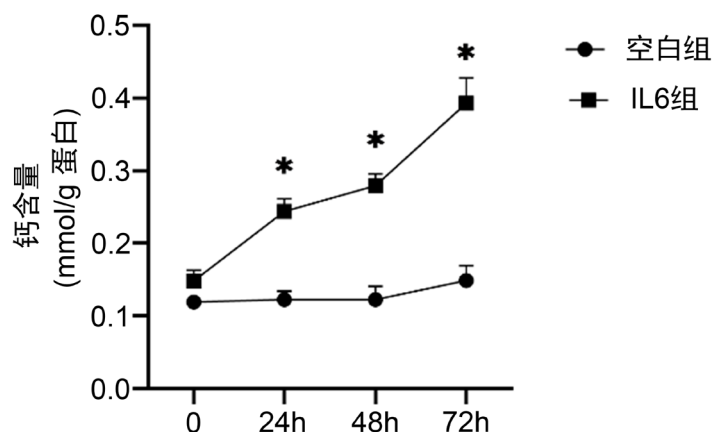


Figure 1. IL6 induces smooth muscle cell calcification
图 1. IL6 诱导平滑肌细胞钙化

3.2. IL6 通过上调 Runx2 诱导平滑肌细胞成骨样分化及钙化

将细胞以 $5 \times 10^4/L$ 接种于 6 孔细胞培养板中, 常规给予 DMEM + 成骨诱导培养。用 100 ng/ml IL6 干预细胞 24 h, 检测钙化相关蛋白 NATP、Runx2 的表达, 结果显示, 较空白对照组 IL6 组 NATP、Runx2 蛋白的表达明显升高, 见图 2。

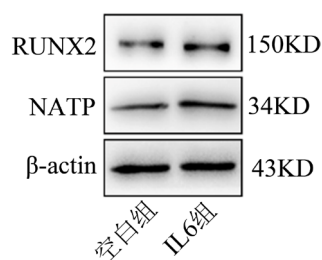


Figure 2. IL6 induces osteogenic differentiation of smooth muscle cells by up-regulating Runx2
图 2. IL6 通过上调 Runx2 诱导平滑肌细胞成骨样分化

3.3. IL6 可以上调平滑肌细胞 Jak2 的表达

将细胞以 $5 \times 10^4/L$ 接种于 6 孔细胞培养板中, 常规给予 DMEM + 成骨诱导培养。用 100 ng/ml IL6 干预细胞 24 h, 检测 Jak2 的表达, 结果显示, 较空白对照组 IL6 组 Jak2 的表达明显升高, 见图 3。

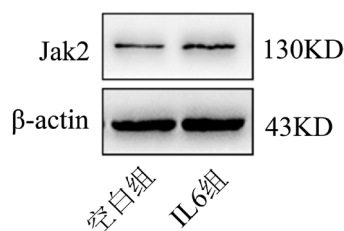


Figure 3. IL6 can up-regulate the expression of smooth muscle cells Jak2
图 3. IL6 可以上调平滑肌细胞 Jak2 的表达

3.4. 抑制 Jak2 的表达可以下调平滑肌细胞成骨样分化

将细胞以 $5 \times 10^4/L$ 接种于 6 孔细胞培养板中, 常规给予 DMEM + 成骨诱导培养。用 100 ng/ml IL6、IL6 + CP690550 干预细胞 24 h, 检测钙化相关蛋白 NATP、Runx2 的表达, 结果显示, 较空白对照组 IL6 组 NATP、Runx2 蛋白的表达明显降低, 见图 4。

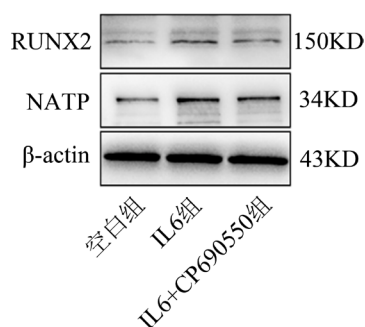


Figure 4. Inhibition of Jak2 expression can down-regulate osteogenic differentiation of smooth muscle cells
图 4. 抑制 Jak2 的表达可以下调平滑肌细胞成骨样分化

4. 讨论

研究结果显示, IL6 刺激细胞可以诱导平滑肌细胞钙化, 较空白组 IL6 组钙盐含量明显升高, 同时 TNAP 的表达明显升高, TNAP 是成骨细胞表型和成骨细胞分化的典型蛋白产物, 其活性增加代表成骨细胞生成的早期典型标志, 是血管钙化的关键酶。研究显示 TNAP 可能作为血管钙化治疗的潜在靶标[12]。在此基础上我们发现 IL6 上调重要信号通路分子 Runx2 的蛋白表达。加入 CP690550 抑制 Jak2 的表达, 可以抑制平滑肌细胞 TNAP 的表达, 同时抑制 Runx2 的表达。

IL6 是 VSMC 成骨样分化及钙化的重要诱导剂。在体外实验中发现, IL-6 通过诱导热休克蛋白 70(HSP70)表达减少 MGP 对骨形态发生蛋白 2 (Bone Morphogenic Protein 2, BMP2)活性的抑制作用, 从而促进了 VSMC 钙化[13]。有趣的是, IL-6 可以直接诱导在非钙化条件下培养的 VSMC 表达 BMP2, TNAP 和骨桥蛋白(Osteopontin, OPN), 从而引起血管钙化[11]。IL-6 是核因子 κ -B 配体(RANKL)受体激活剂的强诱导剂, 抑制 IL-6 的表达从而减少 RANKL 诱导的 TNAP、Runx2 的表达, 并且在体外抑制了 Pi 诱导的 VSMCs 钙化的 RANKL 依赖性扩增[14]。

IL6 介导的信号通路主要有三种: 1) Jak2/Stat3 途径。IL6/IL6R/mgp130 复合物使 Jak2 磷酸化, 然后使 Stat3 发生磷酸化, 从而将信号传递到细胞核, 在肝细胞内启动 CRP 急性相关蛋白的表达, 同时还参与 MSCs 和淋巴细胞的增殖。2) Ras-MAPK 途径, gp130 的同源二聚化反应, 使含有 SH2 结构域的蛋白酪氨酸发生磷酸化, 从而激活 Ras/Raf/MAPK 信号通路, 参与细胞的生长调节。3) PI3K/AKT 途径, 该途径主要发挥抗细胞凋亡的作用[15]。

Jak/Stat 途径主要是干扰素(Interferon, IFN)- γ 和 IL-6 家族成员的受体激活途径, 在免疫调节、免疫细胞增殖方面发挥关键的作用。IL6 通过与 IL6 受体结合, 诱导 gp130 的同源二聚化反应, 从而激活 Jak2 并使其磷酸化, 磷酸化的 Jak2 活化 Stat3 并使其磷酸化, p-Stat3 与 SH2 结合形成二聚体, 并将其转运至细胞核内与 DNA 的特定反应原件结合从而激活靶基因的转录[16] [17]。IL6/Jak2/Stat3 信号通路参与许多重要的生物学过程, 其中包括细胞增殖、分化、凋亡、免疫调节和造血作用等过程[18]。最新研究发现, Jak2/Stat3 信号通路在骨骼的发育、代谢和愈合过程中发挥重要作用, 炎症细胞因子可以通过激活 Jak2/Stat3 信号通路对关节内外的破骨细胞和成骨细胞发挥作用干扰正常的骨骼重塑[19] [20]。CP690550 (Tofacitinib, 托法替尼)是美国 FDA 在 2012 年批准的首个 Jak 抑制剂, 用于治疗对甲氨蝶呤反应不佳的患者的中度至重度活动性 RA, 研究显示托法替尼抑制 JAK3, JAK2, JAK1 的 IC₅₀ 值分别为 1 nM, 20 nM 和 112 nM, 而 Jak3 主要在造血细胞、平滑肌细胞表达, 并不参与骨代谢[21] [22]。所以我们用 CP690550 抑制 Jak2 的表达, 可以抑制平滑肌细胞 TNAP 的表达, 同时抑制 Runx2 的表达。

5. 结论

综上所述, IL6 可能是通过 Jak2 信号转导通路诱导人平滑肌细胞成骨样分化及钙化。

参考文献

- [1] Reaven, P.D. and Sacks, J. (2005) Coronary Artery and Abdominal Aortic Calcification Are Associated with Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes. *Diabetologia*, **48**, 379-385. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1640-z>
- [2] Okuno, S., Ishimura, E., Kitatani, K., Fujino, Y., *et al.* (2007) Presence of Abdominal Aortic Calcification Is Significantly Associated with All-Cause and Cardiovascular Mortality in Maintenance Hemodialysis Patients. *American Journal of Kidney Diseases*, **49**, 417-425. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.12.017>
- [3] Shao, S., Cai, J. and Towler, D.A. (2006) Molecular Mechanisms of Vascular Calcification: Lessons Learned from the Aorta. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **26**, 1423-1430. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000220441.42041.20>
- [4] Shioi, A., Taniwaki, H., Jono, S., Okuno, Y., *et al.* (2001) Mönckeberg's Medial Sclerosis and Inorganic Phosphate in

- Uremia. *American Journal of Kidney Diseases*, **38**, S47-S49. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.27396>
- [5] Massy, Z.A., Stenvinkel, P. and Druke, T.B. (2009) The Role of Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. *Seminars in Dialysis*, **22**, 405-408. <https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2009.00590.x>
- [6] Buturović-Ponikvar, J. (2003) Renal Replacement Therapy in Slovenia: Annual Report 2001. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **5**, v53-v55. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg1048>
- [7] Barreto, D.V., Barreto, F.C., Liabeuf, S., *et al.* (2010) European Uremic Toxin Work Group (EUTox). Plasma Interleukin-6 Is Independently Associated with Mortality in Both Hemodialysis and Pre-Dialysis Patients with Chronic Kidney Disease. *Kidney International*, **77**, 550-556. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.503>
- [8] Caselli, C., De Graaf, M.A., Lorenzoni, V.D., *et al.* (2015) HDL Cholesterol, Leptin and Interleukin-6 Predict High Risk Coronary Anatomy Assessed by CT Angiography in Patients with Stable Chest Pain. *Atherosclerosis*, **241**, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.811>
- [9] Hénaut, L. and Massy, Z.A. (2018) New Insights into the Key Role of Interleukin 6 in Vascular Calcification of Chronic Kidney Disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **33**, 543-548. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx379>
- [10] Zickler, D., Luecht, C., Willy, K., *et al.* (2018) Tumour Necrosis Factor-Alpha Serum Promotes Osteoblastic Transition and Calcification of Vascular Smooth Muscle Cells via Extracellular Signal-Regulated Kinases and Activator Protein1/c-FOS-Mediated Induction of Interleukin 6 expression. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **33**, 574-585. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfx316>
- [11] Sun, M., Chang, Q., Xin, M., *et al.* (2017) Endogenous Bone Morphogenetic Protein 2 Plays a Role in Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Induced by Interleukin6 *In Vitro*. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, **30**, 227-237. <https://doi.org/10.1177/0394632016689571>
- [12] Azpiazu, D., Gonzalo, S. and Villa-Bellosta, R. (2019) Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase and Vascular Calcification: A Potential Therapeutic Target. *Current Cardiology Reviews*, **15**, 91-95. <https://doi.org/10.2174/1573403X14666181031141226>
- [13] Yao, Y., Watson, A.D., Ji, S., *et al.* (2009) Heat Shock Protein 70 Enhances Vascular Bone Morphogenetic Protein-4 Signaling by Binding Matrix Gla Protein. *Circulation Research*, **105**, 575-584. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.202333>
- [14] Wang, Z., Castresana, M.R. and Newman, W.H. (2001) NF-kappaB Is Required for TNF-Alpha-Directed Smooth Muscle Cell Migration. *FEBS Letters*, **508**, 360-364. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03109-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03109-X)
- [15] Moshapa, F.T., Riches-Suman, K. and Palmer, T.M. (2019) Therapeutic Targeting of the Proinflammatory IL-6-JAK/STAT Signalling Pathways Responsible for Vascular Restenosis in Type 2 Diabetes Mellitus. *Cardiology Research and Practice*, **2019**, Article ID: 9846312. <https://doi.org/10.1155/2019/9846312>
- [16] Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., *et al.* (2003) Principles of Interleukin (IL)-6-Type Cytokine Signalling and Its Regulation. *Biochemical Journal*, **374**, 1-20. <https://doi.org/10.1042/bj20030407>
- [17] Hirano, T., Ishihara, K. and Hibi, M. (2000) Roles of STAT3 in Mediating the Cell Growth, Differentiation and Survival Signals Relayed through the IL-6 Family of Cytokine Receptors. *Oncogene*, **19**, 2548-2556. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203551>
- [18] Bolli, R., Dawn, B. and Xuan, Y.T. (2003) Role of the JAK-STAT Pathway in Protection against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **13**, 72-79. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(02\)00230-X](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(02)00230-X)
- [19] Bellido, T., Borba, V.Z., Roberson, P., *et al.* (1997) Activation of the Janus Kinase/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) Signal Transduction Pathway by Interleukin-6-Type Cytokines Promotes Osteoblast Differentiation. *Endocrinology*, **138**, 3666-3676. <https://doi.org/10.1210/endo.138.9.5364>
- [20] Gaber, T., Brinkman, A.C., Pienczkowski, J., *et al.* (2020) Impact of Janus Kinase Inhibition with Tofacitinib on Fundamental Processes of Bone Healing. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 865. <https://doi.org/10.3390/ijms21030865>
- [21] Kawalec, P., Mikrut, A., Wiśniewska, N., *et al.* (2013) The Effectiveness of Tofacitinib: A Novel Janus Kinase Inhibitor, in the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical Rheumatology*, **32**, 1415-1424. <https://doi.org/10.1007/s10067-013-2329-9>
- [22] Verbsky, J.W., Bach, E.A., Fang, Y.F., *et al.* (1996) Expression of Janus Kinase 3 in Human Endothelial and Other Non-Lymphoid and Non-Myeloid Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 13976-13980. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.24.13976>